



哺乳動物のチオールトランスフェラーゼ

溝口 正*

はじめに

先ごろ、大阪郊外のホテルにて国際シンポジウム「グルタチオンセンテニアル」が開催され世界的に著名なアルトン・マイスター教授（米国コーネル大）¹⁾ほか多くの研究者が国の内外から参加した（写真1）。著者らも最近の研究業績を発表する機会を得たがその内容はグルタチオンを補因子とするチオールトランスフェラーゼについてである。チオールトランスフェラーゼの研究を始めて数年になるが本酵素は他の酵素タンパク質に比べて小分子であること、酸や熱に安定であること、基質特異性が広いので生体内の真の働きがまだまだ絞りきれないことから研究の興味が尽きない。

酵素の分布と細胞内局在性

チオールトランスフェラーゼはグルタチオンとジスルフィドとの交換反応を触媒する。本酵素活性は図1に示すように人工基質S-スルホ



写真1 左から順に、2人目が筆者、アルトン・マイスター教授（コーネル大）、ハイレム・ギルバート教授（ベイラー医大）、及びダニエル・ジグラー教授（テキサス大）

*溝口 正 (Tadashi MIZOGUCHI), 大阪大学薬学部, 薬学科生物薬品化学教室, 助教授, 薬学博士
生物化学

システインを用いて反応し生成するグルタチオンジスルフィドを共役系において測定する。著者らはこの活性測定法に従って哺乳動物のチオールトランスフェラーゼを研究しているがこれまでに手掛けた酵素標品²⁾は表1に示した。チオールトランスフェラーゼの分子量はほぼ11kd

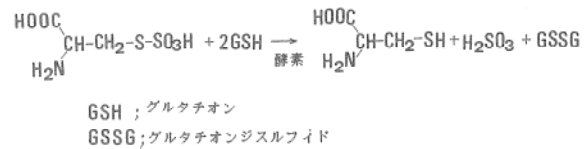


図1 チオールトランスフェラーゼの反応式

しかし等電点は酸性側からアルカリ性側にわたっている。ウシ及びウサギ肝臓について調べたところ、本酵素は細胞内シトソールに局在し、核、ミトコンドリア、ミクロソーム等の細胞顆粒に存在しない。ウサギの各組織や器官からシトソールを調製し酵素活性を測定した結果表2に示すように広く体内に分布する³⁾しかし活性は腸管や脾臓に高く目のレンズには低い。小腸や十二指腸に高い酵素活性がある理由は明らかでないが、本酵素の生理的意義を考える上で重要な事実なのかもしれない。

基質特異性

著者らは大豆から分離精製したトリプシンインヒビターを水素化ホウ素ナトリウムで還元後これにギ酸・過酸化水素の混合試薬による酸化で得たグルタチオンジスルフィドチオスルホネートを反応しインヒビタータンパク質とグルタチオンの混合ジスルフィドを調製した。その際水素化ホウ素ナトリウムの濃度を適宜選ぶことによりインヒビタータンパク質あたりのグルタチオン含有量を調節できることを知った。図2ではグルタチオン2個結合した混合ジスルフィドを示している。ウシ肝臓の酵素を用いて測定

表1 チオールトランスフェラーゼの分子量と等電点

酸素材料	分子量	等電点
ウシ肝臓	11,000	8.1
ウシ白血球	—	8.3
ウシ赤血球	11,000	6.5
ウサギ肝臓	12,400	5.3
ウサギ腹水多形核白血球	—	5.5
ウサギ赤血球	—	5.3
ヒト赤血球	11,000	5.8
ヒト胎盤	11,700	7.5

表2 ウサギの各組織内におけるチオールトランスフェラーゼ活性

組織	活性 (ユニット/湿重量)
小腸	0.82
十二指腸	0.67
脾臓	0.44
腎臓	0.38
胃	0.35
肺	0.23
すい臓	0.21
心臓	0.12
肝臓	0.10
大腸	0.03
目レンズ	0.01

表3 基質に対するチオールトランスフェラーゼの親和性

基質	km 値
タンパク質分子内ジスルフィドの例	
トリプシン	0.051
インスリン	0.014
タンパク質の混合ジスルフィドの例	
大豆トリプシンインヒビターと グルタチオンの混合ジスルフィド	0.016
低分子ジスルフィドの例	
シスチン	0.070
シスタミン	0.120
S-スルホシステイン	0.380

した結果この混合ジスルフィドは酵素との親和性が強く、かつ反応速度も大きい、良好な基質であった。おおむね天然の基質は低分子ジスルフィドあるいはそれらの混合ジスルフィドであるとされているが、著者らの成績(表3)が示

表4 ウサギ多形核白血球の遊走に及ぼすチオールトランスフェラーゼの影響

添加	白血球数	(遊走%)
無添加	154.0±13.4	(100)
チオールトランスフェラーゼのみ	162.6±21.5	(105)
グルタチオンのみ	117.0±15.7	(76)
チオールトランスフェラーゼ及びグルタチオン	96.8±19.1	(62)

多形核白血球 1×10^6 個/ml を 37°C 、110分間遊走した。

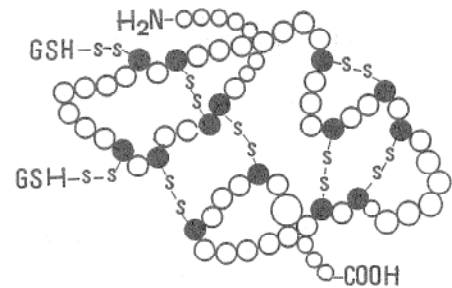


図2 大豆ボウマンバーク型トリプシンインヒビターのグルタチオン混合ジスルフィド BBI-(GSH)₂の場合で他のチオールはジスルフィド架橋を作っている。

すように低分子ジスルフィドに加え、上述のようなタンパク質の混合ジスルフィドも良好な基質になると考えている。

阻害剤と賦活

チオールトランスフェラーゼの阻害剤は水銀やモノヨード酢酸などのチオール試薬が知られているに過ぎない。グルタチオン・インシュリントランスヒドロゲナーゼを阻害する抗生物質のバシトラシンはチオールトランスフェラーゼに無効であり、それに代ってクロラムフェニコールの阻害が新たに見出された。それは非拮抗的でありウサギ肝臓チオールトランスフェラーゼの阻害定数は0.5mMであった。一方入手可能な抗炎症剤12種と抗ヒスタミン剤7種について阻害を検討したところ抗炎症剤ピロキシカムと抗ヒスタミン剤トラニラストに強力な阻害を見出した。非拮抗的阻害であって阻害定数はウシ白血球チオールトランスフェラーゼの場合ピロキシカムが38.1μMまたトラニラストが20.2μMであった。クロラムフェニコールよりさらに強力であることを示している。抗炎症剤ならびに抗ヒスタミン剤の治療効果の大小と阻害作用の

強弱との相関性は認められず、また阻害を発揮するための構造上の特殊性も目下のところ見出せないでいる。

チオールトランスフェラーゼはグルタチオン並びにチオール化合物によって賦活化される。すでに一次構造の解析⁴⁾が進み、それによるとアミノ酸2個をはさんで存在する2つのシステイン残基が活性中心であることが示されており著者らの成績はいずれもそれを支持した。

白血球の遊走阻害と溶血防止

ウサギの腹水から取り出した多形核白血球に免疫複合体刺激を与えるとこの白血球からチオールトランスフェラーゼが放出されることを認めた⁵⁾。細胞融解の指標である乳酸脱水素酵素活性の検出は4%以下にとどまりチオールトランスフェラーゼの放出が単なる細胞破壊によらない事を示している。

生体に浸入した細菌などの異物はこれに向って遊走して来た白血球によって貪食される。この遊走には血清中の補体タンパク質成分が深く係っており、著者らは白血球の遊走活性を測定するのにザイモサン処理したウサギ血清を用いている。表4に示すように遊走実験の際チオールトランスフェラーゼ並びにグルタチオンが共存すると40%の遊走活性の低下が観察された。補体タンパク質成分のいくつかは生理活性に必要な分子内ジスルフィド結合を有するのでこのジスルフィドにチオールトランスフェラーゼが作用したと考えられる。事実分子内にジスルフィド結合をもたない人工遊走因子(fMet·Leu·Phe)はチオールトランスフェラーゼの影響を受けない。

抗体で感作したヒツジ赤血球はその後添加する別のウサギの血清により溶血する。これは血清内に存在する補体タンパク質成分がプロテアーゼ作用を含むカスケード反応をおこし赤血球膜を破壊して溶血するものである。ウサギ血清を予めチオールトランスフェラーゼ及びグルタチオンと短時間前処理しておくると溶血は33%抑制された。遊走阻害にしろ、溶血防止にしろカスケード反応に係わる補体タンパク質成分のいずれかがチオールトランスフェラーゼの働きを

受けたことを示唆している。

チオールトランスフェラーゼによる他酵素の活性調節

チオール・ジスルフィド交換反応を介する酵素の活性調節が注目されている。それはグルタチオンジスルフィドをはじめ低分子ジスルフィド化合物とタンパク質との混合ジスルフィド形成により活性または機能に変動を誘起するからである。著者らはいくつかの酵素を取り上げその活性を指標にしてこの問題に取り組んでいる。

ホスホフルクトキナーゼはグルタチオンジスルフィドと30分間の処理で活性が39%に低下しチオールトランスフェラーゼ及びグルタチオンを作用することによって速やかに活性を回復した。グルタチオンジスルフィドに限らずシステアミンジスルフィドによる失活もチオールトランスフェラーゼで効率的に復元できる。解糖の律速酵素のピルビン酸キナーゼ、薬物代謝酵素のひとつグルタチオンS-トランスフェラーゼ等もシステアミンジスルフィド処理で部分的に失活しチオールトランスフェラーゼによって可逆的に活性を回復した。単に精製酵素に限らず赤血球膜タンパク質にも着目し検討しているが少なくとも混合ジスルフィドの開裂にチオールトランスフェラーゼが関与し、活性調節に機能すると推定できるに至った。

グルタチオンの枯渇とチオールトランスフェラーゼ活性の変動

グルタチオンと包合体を形成するジエチルマレイン酸をマウスに腹腔内投与したところ肝臓シトソール中のチオールトランスフェラーゼ活性は急激に低下しつづいて徐々に回復した。これは肝臓グルタチオンの枯渇・復元とほぼ平行していた。 γ -グルタミル・システイン合成酵素を阻害するブチオニンスルホキシミン投与の場合もグルタチオン枯渇とほぼ平行してチオールトランスフェラーゼ活性が低下した。両薬剤の投与は共に肝臓の乳酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、フルクトースビスホスファターゼの各酵素活性に影響しなかった。グルタチオン枯渇に伴うチオールトランスフェラーゼの活

性低下は特異的であるといえる。活性の復元は活性型酵素への移行の外に酵素分子の増量を伴うこともある。この点は酵素抗体を調製中なのでそれを用いていずれ検討したいと考えている。

む す び

チオールトランスフェラーゼはチオール・ジスルフィド交換を触媒するユニークな酵素であり、その反応機構や生理的意義について今後の成果が期待される。薬学に籍を置く者の一人として酵素製剤としてのチオールトランスフェラーゼがあり得るか否か思索を粘っているところである。

終わりに臨み本稿執筆の機会を与えていただいた大阪大学薬学部岩田宙造教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Meister, A. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 17205-17208.
- 2) T. Mizoguchi, G. Uchida, T. Oshida, T. Terada, and S. Hosomi, (1988) Abstracts of International Symposium "GLUTATHIONE CENTENNIAL" p 114-115.
- 3) M. Hatakeyama, Lee, C., Chon, C., M. Hayashi and T. Mizoguchi, (1985) *J. Biochem.* 97, 893-897.
- 4) Gan, Z.-R. and W.W. Wells, (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 6704-6707.
- 5) M. Hatakeyama, C. Lee, C. Chon, M. Hayashi, and T. Mizoguchi (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 458-463.

